

「植物の機能と制御」
平成12年度採択研究代表者

村田 稔

(岡山大学資源生物科学研究所、教授)

「植物における染色体機能要素の分子的解析と人工染色体の構築」

1. 研究実施の概要

植物の染色体は、3つの機能要素(セントロメア、テロメア、複製起点)によって維持されている。本研究では、最も重要な機能要素、セントロメアについて、そのDNA構造とタンパク質との相互作用を解析し、“分配”という機能がどのように制御されているかを解明する。現在まで、シロイヌナズナにおいて、数メガ塩基対のミニ染色体を発見し、そのセントロメアが予想されるより格段に短いことを明らかにした。今後は、このミニ染色体を遺伝子工学的手法により改変し、新たな巨大DNAクローニングベクターとなる“植物人工染色体”の構築をめざす。また、他の植物においてもセントロメアを解析し、共通する数次構造を明らかにする。

2. 研究実施内容

(1) シロイヌナズナのミニ染色体の解析

シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)において、第4染色体の短腕に由来するミニ染色体を発見し、その構造を解析した。その結果、この染色体の推定サイズは、3-5Mbほどで正常な第4染色体(17.5Mb)よりもかなり短い。また、セントロメアに局在する180-bp反復配列をプローブとしたFISH(蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション)では、このミニ染色体の180-bp反復配列領域は、起源した第4染色体のクラスターよりもかなり短いことが示めされた。つまり、この染色体は、第4染色体のセントロメア領域の長い180-bpクラスター中で切断され、生じたものであると考えられる。この過剰染色体の次代への伝達率は、約30%であることから、有糸分裂、減数分裂においても、セントロメアの機能は正常であると思われる。パルスフィールドゲル電気泳動による解析から、このクラスター長は40~50kbと推定されたが、さらにDNAファイバー FISH法により詳細な解析を続けている。

このミニ染色体は、Landsberg erectaエコタイプに発見されたため、花期早化や低形質転換率などの欠点があった。そこで、5代にわたりColumbiaエコタイプへ戻し交雑した。これらの系統はその後、自殖種子として維持されており、約30%の個体にミニ染色体が伝達されている。この戻し交雑系統においては、ミニ染色体は起源した第4染色体と対合していないことが減数分裂の観察から明らかと

なった。つまり独立の染色体として行動していることになる。

(2) ミニ染色体の短縮化とタギング

ミニ染色体には、18S-25SリボソームRNA遺伝子のクラスターがほぼ全域座乗しているが、形態的な異常は観察されない。しかし、このリボソーム遺伝子のクラスターは3Mbにも及ぶと推定されており、これらの領域を切除することは、このミニ染色体を解析する上で重要である。そこで、シロイヌナズナのテロメアDNAをバイナリーベクターに挿入し、アグロバクテリウムを介してTr4S系統に導入した。外来から導入されたテロメア配列のGリッチ鎖末端部分は、切断されることが他の生物で示されている。それ故、同様のことが、この形質転換体にも期待された。正常の染色体へのテロメア配列挿入は、大きな染色体欠失を引き起こすことも想定され、致死になる確率も高い。一方、ミニ染色体への挿入は、仮に染色体の切断が起こっても他の染色体セットは正常なため、個体への影響は少ないと考えられる。そこで、in planta形質転換法を用いて、数万のオーダーでT0種子を得た。このうち数十が抗生物質(カナマイシン)抵抗性を示したが、ほとんどが途中で枯死した。結果として、4個体の形質転換体が生き残ったが、最も生育の良い1個体がミニ染色体を保持していた。現在、ミニ染色体中に挿入遺伝子があるか、短縮しているか等について調べを進めている。仮にマーカー遺伝子によってタグされていると、今後非常に優れた実験材料となると考えられる。何故なら、ミニ染色体を保持しているTr4S系統は、ミニ染色体をもたない正常系統と形態的な違いが全く見られず、顕微鏡観察による選抜が不可欠となっているからである。このミニ染色体のセントロメアを詳細に解析することにより、植物セントロメアの機能配列を特定できる可能性が極めて高くなる。

(3) セントロメア反復配列の導入

シロイヌナズナのセントロメアに局在する180-bpファミリーは、セントロメアの機能に重要な役割をしていると考えられるが、まだはっきりとした証拠は得られていない。そこで、バイナリーベクター pGA482を用いてシロイヌナズナのゲノムDNAライブラリー作成し、180-bpをタンデムに数十コピー含むクローンを選抜した。これらを、アグロバクテリウムを介してシロイヌナズナに導入し、細胞分裂時の異常を調査した。導入された180-bpクラスターがセントロメアとして機能した場合、ダイセントリック(二動原体型)染色体による染色体橋が観察されるはずであるが、実際にははっきりとした異常は観察されなかった。また、より多くの180-bpコピーを持つクローンを形質転換に利用するため、TAQ(T-DNAのボーダー配列を含むBACベクター)ライブラリーをスクリーニングし、数十のクローンを得た。しかし、すべてインサートサイズが減少しており、形質転換に利用できるクローンは得られなかった。これらのことから、大腸菌やアグロバクテ

リウム中では、反復配列が異常に不安定となっていることが推定された。今後は、これらの系を使わない形質導入の方法が必要となろう。

(4) セントロメア結合タンパク質遺伝子の解析

シロイヌナズナのデータベースから、ヒトのセントロメア結合タンパク質 CENPの相同遺伝子を検索した。その結果、CENP-A, -B, -Cと -Eに相同性を示す遺伝子、ESTが見つかった。このうち、DNAに対する結合性を持つと考えられる CENP-Bと-Cホモログについて、クローン化し、大腸菌で融合タンパク質を発現させた。CENP-Bホモログタンパク質については、抗体を作製し、現在、細胞内の局在性を調査中である。Cについても、抗体作成の準備を進めている。

(5) コムギ特異的セントロメア配列の単離

イネ科植物に保存的なセントロメア局在型レトロトランスポゾン配列をプローブとし、一粒系コムギのBACライブラリーをスクリーニングした。ポジティブクローンからコムギのセントロメア領域には存在するがオオムギには存在しない192塩基対の同方向反復配列を単離した。分子細胞遺伝学的解析の結果、6倍性コムギのゲノム間で同配列の反復数に差異のあることを見出した。また、この配列がコムギ - オオムギ間のロバートソン型転座染色体の解析に有用であることを示した。

(6) コムギのセントロメア反復配列の解析

コムギの動原体に存在する縦列型反復配列をクローニングした。この配列は、元来、オオハマニンニクにおいて染色体末端のヘテロクロマチン形成配列として同定されていたものである。パンコムギおよび近縁種の全動原体に存在し、これまで報告されているTy3/gypsy散在型反復配列と隣り合って存在することが明らかになった。

(7) 機能を持つセントロメア部位を位置づけるFISH-tetrad分析法の開発

連鎖地図上に機能を持つセントロメアを位置づけるのは必ずしも容易でない。この研究では、植物の四分子細胞にFISHを行い、そのシグナルの配置から、プローブとして用いた配列とセントロメアとの距離を求める方法を開発した。

(8) ナス科植物動原体配列の探索と、長鎖DNA配列形質転換系の確立

ペチュニアのセントロメア配列を元に、ナス科（特にタバコ）のセントロメアDNAを取ることを試みている。また、長鎖DNAクローンをタバコに導入するため、BIBAC系の立ち上げを行った。

3. 主な研究成果の発表（論文発表）

なし